



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

CAIO ESLEI RODRIGUES CREMONEZ

**DETECÇÃO DO TRANSPOSON *TN4401* EM ISOLADOS DE BACILOS GRAM
NEGATIVOS PORTANDO *bla_{KPC}* RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA-DF, 2019.

CAIO ESLEI RODRIGUES CREMONEZ

**DETECÇÃO DO TRANSPOSON *TN4401* EM ISOLADOS DE BACILOS GRAM
NEGATIVOS PORTANDO *bla*_{KPC} RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

BRASÍLIA - DF, 2019.

RC915d Rodrigues Cremonez, Caio Eslei
DETECÇÃO DO TRANSPOSON TN4401 EM ISOLADOS DE BACILOS
GRAM NEGATIVOS PORTANDO BLAKPC RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL / Caio Eslei
Rodrigues Cremonez; orientador Alex Leite Pereira; co
orientador Thais Alves da Costa Lamounier. -- Brasília, 2019
22 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. resistência bacteriana. 2. carbapenemase. 3.
enterobactérias. 4. transposon. I. Leite Pereira, Alex,
orient. II. Alves da Costa Lamounier, Thais, co-orient.
III. Título.

CAIO ESLEI RODRIGUES CREMONEZ

**DETECÇÃO DO TRANSPOSON *TN4401* EM ISOLADOS DE BACIOS GRAM
NEGATIVOS PORTANDO *bla_{KPC}* RECUPERADOS DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO NO DISTRITO FEDERAL.**

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Prof(a). Alex Leite Pereira
FCE/UnB

Prof(a). Edgar Guimarães Bione
FCE/UnB

Prof(a). Daniela Castilho Orsi
FCE/UnB

BRASÍLIA - DF, 2019.

RESUMO

A disseminação mundial de genes que conferem resistência aos antibacterianos carbapenêmicos é preocupante, principalmente a carbapenemase de classe A mais comum: KPC. O gene *bla*_{KPC-2} sempre esteve associado à uma isoforma do transposon *Tn4401*, e este elemento genético esteve presente na origem da emergência da resistência aos carbapenens. Carbapenêmicos são uma classe terapêutica de uso restrito hospitalar e a presença de isolados de circulação ambiental portando *bla*_{KPC} associado ao *Tn4401* é altamente perigosa para a população. O trabalho teve como objetivo a detecção do transposon *Tn4401* em isolados de bacilos Gram negativos recuperados de estações de tratamento de esgoto no Distrito Federal, para avaliar se o *Tn4401* está relacionado com *bla*_{KPC-2} em amostras ambientais. A detecção do *Tn4401* foi realizada através de reações em cadeia da polimerase (PCR). Foram realizadas PCR para detecção do *Tn4401* em 85 isolados positivos para *bla*_{KPC} de 8 espécies distintas: *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii* e *Pluribacter gergoviae*. O *Tn4401* foi detectado em todas as cepas testadas. Portanto, através desse estudo é possível afirmar que o transposon *Tn4401* está relacionado com a disseminação de *bla*_{KPC} em espécies de circulação nosocomial e ambiental.

Palavras-chave: resistência bacteriana, carbapenemase, enterobactérias, transposon.

ABSTRACT

The worldwide spread of genes conferring resistance to carbapenem antibacterials is primarily a more common class A carbapenem: KPC. The *bla*_{KPC-2} gene has always been associated with an isoform of the transposon *Tn4401*, and this genetic element was present at the origin of the emergence of resistance to carbapenems. Carbapenems are a therapeutic class of restricted hospital use and a chain of environmental sigmoid presence is associated with *Tn4401* is an important issue for the population. The work had a transduction detection *Tn4401* on *Gram-bacillus libido* recovered from sewage treatment plants in the Federal District to assess whether *Tn4401* is related to *bla*_{KPC-2} in environmental samples. The detection of *Tn4401* was performed by the polymerase chain reaction (PCR). PCR was introduced to detect *Tn4401* in 85 emergency sites of 8 different species: *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii* and *Pluribacter gergoviae*, which had the *bla*_{KPC} gene and in 100% of cases *Tn4401* was detected. Therefore, through this study it is possible to affirm that the transposon *Tn4401* is related to the dissemination of *bla*_{KPC} in the environment.

Keywords: bacterial resistance, carbapenemase, enterobacteria, transposon.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	JUSTIFICATIVA.....	15
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	COLEÇÃO DE ISOLADOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS PORTANDO bla _{KPC}	16
4.2	RECUPERAÇÃO DOS ISOLADOS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	16
4.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	17
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.	CONCLUSÃO	20
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do anel β -lactâmico.....	11
Figura 2 – Mapa genético do <i>Tn4401a</i>	14
Figura 3 – Mapa genético do <i>Tn4401</i> (A) e posição dos primers utilizados na PCR (B).	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de iniciadores (primers)	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bla: Gene produtor de betalactamase

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*

LACEN DF: Laboratório Central de Saúde Pública do DF

LB: *Luria-Bertani*

MALDI-TOF: *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*

mM: Milimolar

pb: Pares de base

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia PBP: Proteínas Ligadoras de Penicilina

TAE: Tris-acetato-EDTA

Tn: Transposon

TSB: Caldo Soja Trypticaseína

μL: Microlitro

μM: Micromolar

μg: Micrograma

°C: Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

As bactérias fazem parte da vida no planeta e podem colonizar mucosas, pele e intestino de homens e animais. Elas possuem um tempo curto de geração (minutos ou horas) e são capazes de adaptarem-se rapidamente, portanto a adaptação da célula bacteriana é uma consequência natural da exposição a diferentes fatores ambientais. O uso indiscriminado de antibacterianos aumenta a pressão seletiva do ambiente e a probabilidade da exposição de bactérias a esses fármacos, podendo facilitar a aquisição de mecanismos de resistência (SANTOS, 2004).

Uma célula bacteriana pode adquirir resistência por modificações em sua estrutura, que ocorrem pela mutação do cromossomo bacteriano, ou pela aquisição de plasmídeos. Outro elemento genético apresentado por células bacterianas são os transposons, segmentos de DNA capazes de transporem-se entre cromossomos, plasmídeos e ambos, sendo assim capaz de promover processos de recombinação genética chamados de transposição (TAVARES, 2014). Transposons são sequências de DNA transponíveis, que podem alterar sua posição no mesmo cromossomo, sofrer transposição entre o cromossomo e plasmídeos ou entre plasmídeos dentro da célula bacteriana. Quando um transposon se move para um novo local, ele pode carregar consigo genes que conferem resistência à antibacterianos. Se ocorrer a transposição de um gene que confere resistência para um plasmídeo, essa bactéria também pode disseminar para a população bacteriana próxima a ela (GRIFFITHS et al., 2008).

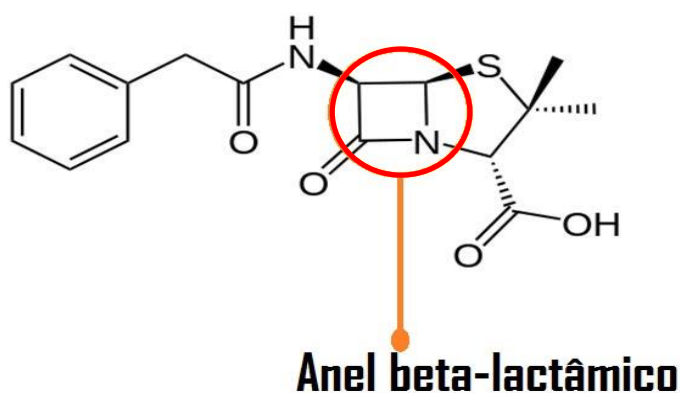
A disseminação da resistência aos antibacterianos têm se tornado uma das principais ameaças à sociedade. Essa preocupação deve aumentar, visto que atualmente a principal força impulsionadora da resistência tem sido a pressão seletiva imposta pelo uso indiscriminado de antibióticos aliada a transferência horizontal de genes (RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2013). A transferência horizontal de genes é a troca genética entre organismos contemporâneos, que pertencem a mesma geração, e pode ocorrer entre espécies diferentes de grupos diferentes.

As bactérias são micro-organismos com alta capacidade de adaptação de acordo com os fatores ambientais em que se encontram, como a exposição aos mais variados antimicrobianos. Multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações genéticas e são capazes de trocar material genético não só entre linhagens da mesma espécie como também de diferentes espécies. A presença de antibióticos no mesmo ambiente de uma bactéria pode levar ao fenômeno ecológico de seleção e emergência da

resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Uma das classes mais utilizadas para o tratamento de infecções associadas à enterobactérias são os β -lactâmicos (ESSACK, 2001), por apresentarem boa eficácia e segurança clínica (TAVARES, 2014). Os antibióticos β -lactâmicos impedem irreversivelmente a formação de peptideoglicano através da inibição da enzima transpeptidase. Essa enzima é responsável pela formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas, que confere rigidez a parede celular bacteriana protegendo a estrutura contra as variações osmóticas do meio. Pertencem à essa classe, os antibacterianos que possuem em sua estrutura um anel β -lactâmico (Figura 1), que combinado com um anel de cinco ou seis membros (tiazolidínico ou dihidrotiazínico, respectivamente) mimetizam o resíduo dipeptídico terminal D-ala-D-ala da cadeia de peptideoglicano, impedindo a ação correta da transpeptidase, levando à lise da célula pela perda do controle osmótico (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 1 – Estrutura química do anel β -lactâmico.



Fonte: Adaptado de FERREIRA, 2017.

As enzimas β -lactamases são responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico, tornando ineficazes os antibióticos β -lactâmicos. Essa enzima foi descoberta em 1940 por Abraham e Chain antes mesmo da difusão do uso de penicilina em infecções bacterianas (BUSH et al., 1985). Nem todas as bactérias são capazes de produzir essas enzimas, porém elas podem adquirir através da troca de material genético (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Em bactérias Gram negativas, as β -lactamases podem ser encontradas no

espaço periplasmático e são codificadas por genes que se localizam no cromossomo ou em plasmídeos. Os transposons podem ampliar a mobilidade genética dessas enzimas, por facilitarem a transferência de genes de *bla* (BUSH, 1988; Williams, 1999).

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são as carbapenemases mais frequentemente detectadas em bactérias que apresentam essa resistência, sendo KPC-2 a variante mais comum. Essas enzimas foram identificadas em 2001 na Carolina do Norte, Estados Unidos da América (EUA), entre isolados de *Enterobacteriaceae* que tinham distribuição geográfica limitada ao leste dos EUA até 2005. Atualmente existem relatos de bactérias produtoras de KPC por todo o planeta, não só entre *Enterobacteriales* como também em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp.. Uma das possíveis explicações para essa ampla disseminação é que durante a emergência da resistência a carbapenens, genes *bla*_{KPC} presentes na linhagem *K. pneumoniae* ST258 foram espalhados por plasmídeos, que na maioria dos casos possuem a capacidade de transferirem-se para outras espécies de enterobactérias (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011).

Para a identificação dos genes de carbapenemase, utiliza-se principalmente de técnicas moleculares como as reações em cadeia da polimerase (PCR) que possuem alta sensibilidade e alta especificidade (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

A família *Enterobacteriaceae* faz parte da ordem *Enterobacteriales* e é composta por bacilos Gram negativos que fazem parte da microbiota intestinal e pertencem ao grupo de patógenos mais comum entre humanos. São a principal fonte de infecções hospitalares por se espalharem facilmente pelo ambiente, como água e alimentos contaminados. Também são capazes de adquirir com certa facilidade material genético pela transferência horizontal de genes, mediada por plasmídeos e transposons (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

As drogas mais eficazes, dentre os β -lactâmicos, são os carbapenens sintéticos: imipenem, ertapenem, meropenem e doripenem. O uso dessas drogas é limitado ao ambiente hospitalar e são utilizadas como último recurso em infecções nosocomiais, para manter sua eficácia clínica (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

A resistência da espécie *K. pneumoniae* aos carbapenens está associada principalmente a aquisição de β -lactamases hidrolisadoras de carbapenem através da transferência horizontal de genes. Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC

estão frequentemente associados a infecções nosocomiais principalmente pelo uso restrito de carbapenems em ambientes hospitalares (RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2013; CUZON et al., 2010).

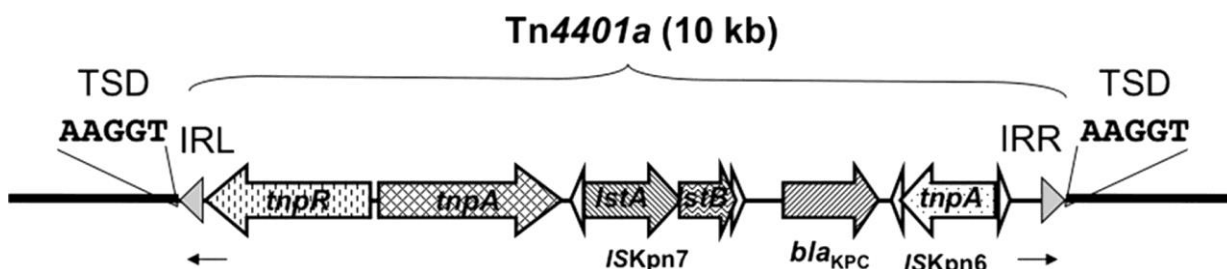
O gene *bla*_{KPC-2} foi localizado em um transposon, do grupo Tn3, que foi identificado como *Tn4401*. Até então 3 isoformas do *Tn4401* foram identificadas e elas variam entre 100-200 pares de base (pb) (a, b ou c), esses transposons podem estar associados à origem da mobilização de KPC para plasmídeos de diferentes tamanhos em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. O gene *bla*_{KPC-2} em plasmídeos sempre esteve associado ao *Tn4401* (NAAS et al., 2008).

Diversos clones de *K. pneumoniae* portando plasmídeos distintos possuem uma estrutura genética em comum (*Tn4401*), que pode estar associado à origem da ampla disseminação desse gene de resistência pelo planeta. O elemento genético *Tn4401* é portador do gene *bla*_{KPC-2} e é responsável pela mobilização e inserção de *bla*_{KPC} em plasmídeos variados (CUZON et al., 2010).

Isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de KPC foram reportados inicialmente em 2006 na Colômbia, logo em seguida foram reportados casos em Porto Rico, Trinidad e Tobago, EUA e China. Em quase todos os casos, o gene *bla*_{KPC-2} foi identificado sendo transportado por plasmídeos de diferentes tamanhos que estavam associados com a isoforma *Tn4401b* ou à uma estrutura contendo parte do *Tn4401* (CUZON et al., 2011).

O transposon *Tn4401* é composto por: transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), gene *bla*_{KPC-2} e duas sequências de inserção (ISKpn6 e ISKpn7), além de possuir em suas extremidades duas sequências de repetição de 39 pb invertidas, como demonstrado na figura 2. As isoformas a, b e c do *Tn4401* variam de 100 a 200 pb a montante do gene *bla*_{KPC-2} e apesar de existirem relatos da presença de diferentes inserções a montante do gene, as sequências a jusante sempre eram semelhantes ao *Tn4401*, sugerindo que essas sequências de inserção foram inseridas no *Tn4401* (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011).

Figura 2 – Mapa genético do *Tn4401a*.



Fonte: CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011

Segundo Cuzon, Naas e Nordmann (2011) o *Tn4401* é um transposon ativo com capacidade de mobilizar e transferir os genes *bla_{KPC}* com alta frequência. Esse transposon foi identificado em isolados de diferentes locais e diferentes espécies, entre a família *Enterobacteriaceae* e em *P. aeruginosa*, e variavam em tamanho nos plasmídeos inseridos e na posição nos cromossomos.

O uso de antibióticos pela medicina humana e veterinária e a falta de tratamento adequado do esgoto urbano, industrial e hospitalar promovem a presença de antibióticos e bactérias resistentes no ambiente, gerando grande pressão seletiva nos efluentes que recebem esses esgotos, com isso essa poluição pode promover a disseminação da resistência entre a comunidade (FUENTEFRÍA et al., 2008).

A falsa segurança de que as doenças infecciosas estavam controladas e que os antibióticos eram eficazes para a maioria dessas doenças, gerou entre os prescritores a utilização desses fármacos de forma indiscriminada ou até inadequada, promovendo erroneamente o uso de antimicrobianos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KADOSAKI; SOUSA; BORGES, 2012). Devido à falta de novos fármacos antibacterianos, a eficácia das drogas existentes deve ser preservada o máximo possível, visto que a susceptibilidade dos produtores de carbapenemase em enterobactérias às drogas antimicrobianas existentes é quase nula, todo cuidado é pouco para a prevenção de infecções, até mesmo as mais comuns devido à falta de tratamento eficaz (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Um dos pilares da constante resistência bacteriana é a infecção hospitalar. Atualmente os hospitais possuem uma grande variedade de micro-organismos resistentes, principalmente as bactérias e dentre essas as Gram negativas se destacam. A diminuição das infecções hospitalares levará a diminuição da resistência bacteriana, pois reduzindo o uso de antibióticos diminui-se a forte pressão seletiva nos hospitais (KADOSAKI; SOUSA; BORGES, 2012).

A constante ameaça de emergência de bactérias resistentes leva à preocupação em prevenir a disseminação das existentes e também à prevenção do surgimento de novas linhagens resistentes (DZIDIC, SUSKOVIC, KOS, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A disseminação mundial de genes que conferem resistência aos antibacterianos carbapenêmicos é preocupante, principalmente a carbapenemase de classe A mais comum: KPC. O gene *bla*_{KPC-2} sempre esteve associado à uma isoforma do transposon *Tn4401*, e este elemento genético esteve presente na origem da emergência da resistência aos carbapenens. Carbapenêmicos são uma classe terapêutica de uso restrito hospitalar e a presença de isolados de circulação ambiental portando genes *bla*_{KPC} associado ao *Tn4401* é altamente perigosa para a população (CUZON et al., 2010). Portanto, busca-se, através deste trabalho, uma visão geral sobre a dispersão de *bla*_{KPC} no Distrito Federal e quão ampla é a dispersão desse gene em isolados ambientais, além de verificar se a dispersão em amostras ambientais ainda é sustentada pelo transposon *Tn4401*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença do transposon *Tn4401* em isolados de bacilos Gram negativos resistentes aos carbapenens recuperados de Estações de Tratamento de Esgoto no Distrito Federal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir uma bacterioteca de bacilos Gram negativos portando *bla*_{KPC};
- Detecção do transposon *Tn4401*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLEÇÃO DE ISOLADOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS PORTANDO *bla_{KPC}*

Os isolados bacterianos foram selecionados em meio a uma coleção já existente de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenem, recuperados em amostras de água e esgoto em ETEs no Distrito Federal. Esse recorte foi realizado na coleção estoque, presente no Laboratório 2 da Faculdade de Ceilândia (FCE), estabelecida em projeto que visa estudar a contaminação por bactérias multirresistentes em corpos d'água no DF. Esses isolados foram estocadas em ágar nutriente à temperatura ambiente. A detecção de *bla_{KPC}* foi realizada por PCR antes da estocagem em ágar nutriente e a identificação das espécies foram realizadas no Laboratório de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) utilizando o sistema automatizado MALDI TOF *VITEK® MS*.

Foram realizados experimentos nos laboratórios da Universidade de Brasília (UnB) - FCE em isolados recuperados do estoque do projeto. Para montagem da bacterioteca deste trabalho, tive acesso aos isolados das coletas que ocorreram de abril à agosto de 2017, 85 isolados que possuem *bla_{KPC}* foram recuperados para detecção do *Tn4401*.

4.2 RECUPERAÇÃO DOS ISOLADOS E EXTRAÇÃO DE DNA

As cepas que apresentaram positividade para o gene *bla_{KPC}* e estavam estocadas em ágar nutriente, foram repicadas com o auxílio de uma alça descartável estéril em caldo LB (*Luria-Bertani*) Miller, meio rico utilizado para o crescimento de culturas puras, e incubadas a 37°C por 24 horas. A extração do DNA bacteriano das cepas foi feita utilizando 1 mL de cultura bacteriana em caldo LB, centrifugou-se por 3 minutos à 3000g e o sobrenadante foi descartado, em seguida adicionou-se 1 mL de água deionizada, houve homogeneização no vórtex e centrifugou-se por 1 minuto à 3000g, adicionou-se 1 mL de TRIS 10 mM pH 8,0, homogeneizou-se no vórtex e foi levado à fervura por 15 minutos, por fim, centrifugou-se por 1 minuto à 11000 rpm e 600 µL do sobrenadante foram armazenados sob refrigeração para serem utilizados como fonte de DNA nas reações de PCR.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A detecção do transposon *Tn4401* e do gene *bla_{KPC}* foi feita por PCR. As reações de PCR foram realizadas utilizando o seguinte protocolo para preparo do MIX (constituintes – quantidade em μL): Água deionizada – 13,56; Tampão 10X – 3,0; Primer F 1 μM – 3,0; Primer R 1 μM – 3,0; DNTP 0,2 mM – 0,24; e TAQ 1 U – 0,2; totalizando 23 μL de MIX para cada reação que posteriormente foram adicionados separadamente à 7 μL de DNA de cada amostra, homogeneizados e levados ao termociclador, para que a replicação do DNA pudesse ocorrer. Os ciclos de temperatura utilizados no termociclador para amplificação do DNA foram os seguintes: 90°C por 2 minutos, para facilitar o alcance da temperatura de desnaturação do DNA; 94°C por 45 segundos, para desnaturação do DNA que servirá como molde para o próximo ciclo; 57°C por 45 segundos, para anelamento dos iniciadores (primers) à fita simples desnaturada; 72°C por 1 minuto, para a enzima TAQ estender o molde já anelado; e 72°C por 2 minutos, para extensão final do DNA; sendo que os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 30 vezes enquanto os demais ciclos repetem-se apenas 1 vez. Após a amplificação foram adicionados 3 μL de tampão de amostra em cada reação, que foi homogeneizado junto às reações antes de adicionar 10 μL de cada reação em cada poço do gel de agarose submerso em tampão TAE 1x. Foi utilizado o gel de agarose 1%: 1 mL de tampão TAE 50x; 98 mL de água destilada; e 1 g de agarose, que foram aquecidos até total dissolução. A eletroforese ocorreu com as seguintes configurações: 120v; 300 mA; e 130w por 25 minutos. Após a eletroforese o gel de agarose foi levado ao banho de brometo (1 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos e observado através de luz ultravioleta, a positividade do transposon *Tn4401* nas amostras foram verificadas por bandas geradas em 651 pb.

Os primers foram desenhados para amplificar a sequência que vai da sequência de inserção ISKpn6 até o gene *bla_{KPC}*, como mostrado na Figura 3, onde a imagem A apresenta o mapa genético do transposon *Tn4401* e a imagem B apresenta o mapa dos primers utilizados para amplificação do *Tn4401*, que detalha onde os primers do *Tn4401* e de *bla_{KPC}* amplificam. Os primers identificam a região 3' do ISKpn6 e a região 3' do gene *bla_{KPC}*, pois são adjacentes e são transcritos convergentemente (possuem transcrições em sentidos opostos), demonstrando que *bla_{KPC}* está inserido no *Tn4401*.

Enterobacter cloacae; 6 *Pseudomonas putida*; 2 *Pseudomonas aeruginosa*; 2 *Pantoea agglomerans*; 2 *Citrobacter freundii*; e 1 *Pluralibacter gergoviae*. A PCR para detecção do *Tn4401* foi identificada como positiva em 100% (n=85) das cepas testadas. Portanto, é possível observar que a disseminação de *bla*_{KPC} nos isolados ambientais utilizados nesse estudo estão associadas ao transposon *Tn4401*.

A presença de espécies de circulação nosocomial como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* portando *bla*_{KPC} demonstram a contaminação do ambiente por efluentes hospitalares (KHAN; AHMAD. MEHBOOB, 2015). A presença de espécies ambientais portando *bla*_{KPC} como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans* e *Pluralibacter gergoviae* sugere que a aquisição de *bla*_{KPC} ocorre através do contato com espécies hospitalares (HALPERN et al., 2011)

A transferência de *bla*_{KPC} pelo transposon *Tn4401* parece amplamente disseminada no meio ambiente, visto que ele se encontra presente até mesmo em espécies intrinsecamente resistentes a carbapenems (resistência não enzimática), como *Pseudomonas putida*.

De acordo com os resultados obtidos, a presença do *Tn4401* e de *bla*_{KPC} em *Aeromonas hydrophila*, *Pantoea agglomerans* e *Pluralibacter gergoviae* fortalecem a ideia de que a dispersão do *Tn4401* em isolados ambientais podem ser preocupantes, visto que são espécies raramente citadas portando *bla*_{KPC}. Desde de dezembro de 2004 tem-se verificado a importância de *Aeromonas spp.* como patógeno para humanos pois após o tsunami que ocorreu na Tailândia, 20% das infecções em tecidos moles ocorreram por esse gênero (TAVARES; CERESER; TIMM, 2015).

Genes de resistência, como *bla*_{KPC}, têm sido cada vez mais relatados nos últimos anos, principalmente entre as enterobactérias. Uma das principais fontes dessa disseminação pode ser o esgoto (ZURFLUH et al., 2017), que associado ao uso abusivo de antibacterianos pela prática médica, prática veterinária e em outras atividades humanas, como a produção de carne, expõe a comunidade a bactérias portando genes de resistência (FUENTEFRÍA et al., 2008).

Inicialmente o gene *bla*_{KPC} foi identificado como gene cromossomal não mobilizável, até ser incorporado ao transposon *Tn4401*, que possibilitou a disseminação desse gene em escala mundial. Desde os surtos de infecções hospitalares na costa leste dos EUA em 2005, *bla*_{KPC} tem sido identificada em

plasmídeos distintos de espécies distintas sempre inserido em estruturas genéticas semelhantes ao *Tn4401* (NAAS et al., 2008; CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011; MATHERS et al., 2016).

A presença de *bla_{KPC}* junto ao *Tn4401* em espécies ambientais pode ser considerada preocupante, visto que esse elemento genético é capaz de realizar transposição com certa facilidade para plasmídeos em diferentes espécies de bacilos Gram negativos de diferentes nichos ecológicos (CUZON; NAAS; NORDMANN, 2011).

6. CONCLUSÃO

O transposon *Tn4401* é o elemento genético responsável pela disseminação de *bla_{KPC}* em isolados ambientais recuperadas em ETEs no Distrito Federal. A detecção de *Tn4401* em espécies ambientais demonstra que *bla_{KPC}* pode ser transferido com certa facilidade e alerta para a emergência de reservatórios ambientais de genes de resistência a carbapenem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNEZ, C. et al. Immediate allergic reactions to cephalosporins: Evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 117, n. 2, p.404-410, fev. 2006. Elsevier BV.
- BUSH, K. b-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clinical Microbiology Reviews.**, 1: 109-123, 1988
- BUSH, K. et al. K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother** 33: 259-276, 1989.
- CUZON, G. et al. Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 55, n. 11, p.5350-5353, 15 ago. 2011. American Society for Microbiology.
- CUZON, G. et al. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene1. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.1349-1356, set. 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional Characterization of *Tn4401*, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 55, n. 11, p.5370-5373, 15 ago. 2011. American Society for Microbiology.
- DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11-21, 2008.
- ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391–9, 2001.
- FERREIRA, F. <http://pharmacarenatal.blogspot.com>. **Pharma Care**, 2017. Disponível em: <<http://pharmacarenatal.blogspot.com/2017/03/interacao-entre-alimentos-e-os.html>> Acesso em: 05 maio. 2019.
- FUENTEFRIA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.470-473, out. 2008.
- GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introduction to genetic analysis**. 9. ed. New York: W.h. Freeman And Co., 2008.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Biblioteca Digital da Produção Intelectual**, São Paulo, v. 33, n. 3, p.667-679, fev. 2010.
- HALPERN, M. et al. Biological warfare of spiny plants, **Advances in Applied Microbiology**, [s.l.], p97-116, 2011. Elsevier.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.128-135, maio 2012.

KHAN, H. A.; AHMAD, Aftab; Mehboob, Riffat. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.509-514, jul. 2015

LASCOLS, C. et al. Using Nucleic Acid Microarrays To Perform Molecular Epidemiology and Detect Novel β -Lactamases: a Snapshot of Extended-Spectrum β -Lactamases throughout the World. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.1632-1639, 8 fev. 2012. American Society for Microbiology.

MATHERS, A. J. et al. Chromosomal Integration of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene, bla KPC, in *Klebsiella* Species Is Elusive but Not Rare. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.23-35, 28 dez. 2016. American Society for Microbiology.

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase blaKPC Gene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.1257-1263, 28 jan. 2008. American Society for Microbiology.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–8, 2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **Int J Med Microbiol**. 303: 293– 297, 2013.

SANTOS, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, Santa Catarina 13 (Esp): 64-70, 2004. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=71409807>. Acesso em: 19 nov. 2018.

TAVARES, A. B.; CERESER, N. D.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 82, p.1-8, 7 abr. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2014.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12: 3-7, 1999.

ZURFLUH, K. et al. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**,